# Ricerche sulla costituzione dei plastidi, in rapporto specialmente alla presenza dei lipoidi ed alla funzione fotosintetica dei cloroplasti.

Nota di

**Luigi Buscalioni.**

La costituzione chimica della clorofilla ed il complesso processo dell'assimilazione fotosintetica collegato a tale sostanza furono oggetto di numerose osservazioni, le quali hanno portato a pressochè inaspettate conclusioni.

Per quanto concerne la costituzione chimica della clorofilla basterà ricordare le osservazioni del Willstaetter, dello Tswett, dello Tschirch, del Marklewský e Schunch (per citare soltanto i nomi più noti), dalle quali è risultato che la clorofilla, estremamente affine alla sostanza colorante del sangue (come l'attesta l'esame spettroscopico e chimico), deve la sua mirabile proprietà di poter scindere la molecola di $CO_2$, fra l'altro, forse all' intervento del magnesio. Molti altri dati sono venuti in luce dall'indefesso studio del pigmento verde, ma non è il caso qui di insistere sugli stessi perchè troppo lungi dal nostro argomento ci porterebbe la loro enumerazione.

Del pari le ricerche sulla funzione del pigmento clorofilliano non furono meno feconde di risultati, specialmente in questi ultimi anni; grazie in particolar modo ai metodi di studio introdotti dallo Sachs, dal Bach, dal Pollacci e da altri autori il processo fotosintetico e stato affrontato con successo. Qualche grave lacuna rimane ancora, poichè se è noto che qualono prodotti finali dell' assimilazione devi considerarsi l'amido o gli zuccheri, non è ancora stata ben chiarita la successione dei processi chimici grazie ai quali il cloroplasto in virtù del suo pigmento verde, scomponendo il $CO_2$ arriva a formare i sopra citati idrati di carbonio. Appare tuttavia sempre più plausibile, anche dall' osservazione sperimentale, che il cloroplasto formi, quale prodotto intermediario l'aldeide formica che poi si polimerizza.

Ed anco, malgrado le numerose e talora geniali ricerche sia dei botanici che dei chimici, siamo tuttavia ben lontani dall' aver risolto il grande pro-

blema della costituzione chimica dei plastidi e delle sostanze che essi includono. Noi sappiamo invero che, oltre alla clorofilla, il plastidio clorofilliano contiene anche altre sostanze a costituzione tutt' altro che chiara, fra le quali hanno una particolare importanza le carotine, la xantofilla ed altri prodotti pigmentati. Devesi ancora tener presente che la clorofilla sotto l'azione di determinati agenti e specialmente delle basse temperature va soggetta a profonde alterazioni, o per lo meno appare associata a speciali pigmenti (ad esempio pigmento bruno nelle foglie ibernanti delle Conifere).

Infine non si può del tutto escludere che differenti piante contengano differenti pigmenti clorofilliani.

Per quanto concerne il processo fotosintetico è noto che esso non si compie in tutte le piante in modo analogo. Basterà infatti rilevare in proposito che talune Monocotiledoni (*Musa* ecc.) fabbricano, nelle condizioni ordinarie, solo zuccheri, mentre in molte Alghe invece dell' amido si hanno altri corpi, e persino olio e sostanze grasse. Ma vi ha di più: da qualche autore è stato rilevato che gli olii possono facilmente dar origine all' amido o viceversa, mercè un processo che dal punto di vista chimico appare tuttavia piuttosto sui generis.

Non si può pertanto far a meno di ritenere che il processo dell' assimilazione clorofilliana sia piuttosto polimorfo e che, oltre all' amido, compaiano spesso sotto l'azione dello stesso, altri corpi o come prodotti in certo qual modo collaterali, o come elementi intermediari, predestinati a trasformasi più o meno tardi in amido.

Stabilito pertanto che in cotesti singolari rapporti tra sostanze così differenti fra loro, quali sono l'amido, le aldeidi ed i corpi grassi, si hanno in certo qual modo le prove dell' esistenza di processi fisiologici altamente complessi in seno ai plastidi clorofilliani e all' attuazione dei quali la clorofilla prende o direttamente od indirettamente parte assieme alla Xantofilla[1]), mi sono proposto il compito di cercare se l'olio e i corpi grassi o, in tesi generale, i corpi di natura lipoidea siano parimente presenti nei cloroplasti, cromoplasti e leucoplasti delle piante superiori, a riguardo delle quali la letteratura botanica è pressochè sfornita di osservazioni, avendo soltanto qualche autore, come ad es. il Böhm, accennato alla presenza di sostanze oleose nei plastidi di poche Monocotiledonee ed eseguite su queste delle esperienze fisiologiche che non approdarono, per altro, a risultati molto concludenti.

Per lo studio di questo problema mi sono valso del Sudan III, la quale sostanza, da tempo impiegata nella tecnica microscopica zoologica e medica, fu da me segnalata ai botanici quale mezzo quanto mai adatto per la ricerca dei grassi, oli e resine e per metter in evidenza la suberina e la

1) Non è il caso qui di insistere sui pigmenti degli organismi inferiori i quali, stando alle ricerche di qualche autore, avrebbero pure un' azione nel potere di assimilazione di detti organismi.

cutina nei tessuti vegetali (V. BUSCALIONI, Un nuovo reattivo per l'istologia vegetale. Malpighia 1898 Vol. XII).

Con questo reattivo i corpi lipoidei contenuti nei plastidi si colorano quasi sempre in rosso, più o meno vivo, o in giallo o giallo aranciato. Per la ricerca di siffatti corpi occorre adunque che le sezioni degli organi sottoposti allo studio siano lasciate per un po' di tempo ($^1/_2$ ora a 1 ora e più) in una soluzione alcolica concentrata e filtrata del reattivo: i preparati, di poi lavati rapidamente in alcool diluito, vengono esaminati, in glicerina o glicero-gelatina, con un obbiettivo ad immersione omogenea o meglio ancora con un sistema apocromatico.

Giova qui notare che i preparati colorati col Sudan III se contengono corpi su cui il reattivo possa fissarsi conservano la tinta pressochè immutata per parecchi anni, di guisa che si possono effettuare dei confronti quanto mai istruttivi tra i preparati di organi stati trattati col reattivo, ad esempio d'inverno, e quelli degli stessi elementi o tessuti raccolti e colorati in un' altra epoca dell' anno. Il che, come vedremo in seguito, ha non poca importanza.

Le ricerche eseguite col Sudan III mi hanno portato a conclusioni non del tutto prive d'interesse, per quanto concerne la funzione dei plastidi clorofilliani e dei cromoplasti in genere, le quali verranno quanto prima rese di pubblica ragione, dettagliatamente, nella Malpighia. Ma poichè non mi sarà dato di licenziare alle stampe il lavoro fino a che non avrò compiuto alcune ricerche attualmente in corso, non credo del tutto inutile riportare qui, per sommi capi, quanto di più importante è venuto in luce dagli studi già compiuti.

Fino ad ora mi sono limitato a studiare la distribuzione dei lipoidi nei cloro- cromo- e leucoplasti, nei vari periodi dell' anno e nei vari stadi di sviluppo della pianta: è pero mia intenzione completare gli studi con ricerche d'indole sperimentale, talune delle quali sono già in corso.

Circa 150 specie appartenenti a famiglie disparate furono oggetto di studio e per ognuna di esse fu mia cura di esaminare, ad intervalli di circa un mese e per la durata di un anno, preparazioni microscopiche di foglie e di fusti stati sottoposti al Sudan III.

Quasi costantemente i cloroplasti contenuti nelle foglie presentano nel loro interno delle granulazioni vivamente colorate, nel modo sopra indicato, dal reattivo, le quali costituiscono appunto i così detti granuli o corpi lipoidei. Solo in qualche caso il Sudan III colora in bruno siffatte granulazioni e ciò probabilmente perchè la sostanza colorante va in contro ad un ossidazione più o meno intensa per parte di speciali corpi (Enzimi ossidanti?) contenuti nel plastidio e forse anco nel lipoide stesso su cui il Sudan III sifissa.

Fino ad ora non ho potuto indagare a fondo le cause della differente colorazione assunta dai granuli lipoidei. Ma se trattasi realmente di processi ossidativi cui andrebbe incontro la sostanza colorante, i quali quanto

più agirebbero intensamente tanto più forte imbrunimento provecherebbero nel reattivo, egli è ovvio che si avrebbe nel Sudan III un ottimo mezzo per mettere in evidenza i processi ossidativi che avvengono in seno ai plastidi e i corpuscoli cui tali processi sono collegati.

Non meno interessanti sono le differenze cromatiche reperibili nei vari tessuti dalle foglie.

Innanzi tutto è stato osservato che negli stomi, in qualunque mese si osservino le foglie, il Sudan III mette in evidenza un grandissimo numero di granuli lipoidei, per lo più piccoli o mediocri. A causa dell' estrema abbondanza loro riesce malagevole, il più delle volte, di stabilire se questi corpi si trovino in seno ai plastidi, o non piuttosto nel protoplasto. Con un attento esame ho tuttavia potuto assodare che nel maggior numero dei casi i granuli in questione, se abbondano nel plasma, sono tuttavia anche presenti nei plastidi. La quantità loro va incontro a lievi oscillazioni a seconda dei mesi.

Nella grande maggioranza delle piante studiate i lipoidi sono presenti in maggior copia nei plastidi verdi del palizzata, anzichè in quelli del lacunoso. Qualche volte poi abbondano in uno degli strati del palizzata, scarseggiano negli altri e non di rado anche sono più diffusi nelle parti profonde o viceversa superficiali degli elementi di uno determinato strato del tessuto.

La grande diffusione dei lipoidi nei cloroplasti del palizzata è un documento di altissima importanza che non può esser trascurato da coloro che si occupano della funzione clorofilliana in rapporto colla radiazione.

Ben di rado quando sono presenti nel palizzata i lipoidi endoclorofilliani difettano nel lacunoso: essi si fanno ivi solo più scarsi e più piccoli. Occorre però notare che con grande frequenza tornano a ingrandire e a rendersi più abbondanti negli strati superficiali del tessutto, il che pure accenna a qualche rapporto colla radiazione.

Non mi fu dato di constatare, salvo casi eccezionali, che in vicinanza delle camere retrostomatiche i lipoidi endoclorofilliani siano più numerosi che altrove. All' opposto pare che si verifichi frequentemente l'aumento loro ai margini delle foglie, nelle vicinanze del così detto cordone meccanico, dove quasi sempre fanno difetto gli stomi.

Qualche rara volta, per ragioni che pel momento mi sfuggono, ho potuto notare un prevalente sviluppo dei lipoidi in questione nel tessuto lacunoso, anzichè nel palizzata. Parimenti si è constatato che in qualche tipo i granuli mancano del tutto nei cloroplasti. Così ad esempio di rado li ho trovato nelle Graminacee studiate, o sono ivi quasi sempre scarsissimi.

Se pressochè generale è la presenza di lipoidi clorofilliani, devesi tuttavia aver presente che l'immagazzinamento degli stessi va incontro a notevoli oscillazioni nel corso dell' anno. Le mie osservazioni in proposito si riferiscono pressochè unicamente al territorio di Catania, pochi essendo

i dati che ho potuto ricavare da altre regioni e specialmente da quelle soggette a freddi intensi invernali e forti calori estivi. Uno studio in questo senso, fatto in differenti regioni della terra, sarebbe fecondo di risultati interessanti.

In tesi generale è lecito affermare che la provvista dei lipoidi endoclorofilliani varia nei differenti mesi dell' anno. Per talune specie sempreverde maggiore è l'accumulo, ad esempio, nell' inverno poi si riduce in primavera ed estate per tornare a crescere in autunno: altre specie mi hanno invece presentato combinazioni differenti.

Anche l'età della foglia ha una spiccata influenza sullo sviluppo dei granuli. Le foglie giovani, non ancora assimilanti, ne sono pressochè del tutto sfornite; i plastidi cominciano a fabbricare lipoidi quando si inizia la assimilazione; da questo istante si ha un continuo aumento dei granuli lipoidei che raggiunge il massimo collo stato adulto dell' organo. Raggiunto questo si iniziano le oscillazioni nella provvista.

La mancanza di lipoidi endoclorofilliani nelle foglie giovani ha un alto significato fisiologico e chimico poichè starebbe ad indicarci che i corpi in questione non dovrebbero esser ritenuti come identici alla xantofilla, essendo questa sostanza di gia presente nei fillomi giovani, ai quali impartisce appunto assai spesso la caratteristica colorazione giallognola.

Le foglie che ci avvicinano alla senilità e all' ingiallimento si fanno sempre più ricche di lipoidi, tanto che al fine i loro cloroplasti sono trasformati in ammassi di granuli grandi e piccoli, fortemente colorabili in rosso o giallo col Sudan III. Il grande sviluppo dei lipoidi nelle foglie vecchie (che del resto ha del pari luogo nelle foglie eziolate) starebbe ad indicarci, contrariamente a quanto si è osservato nelle foglie giovani, che vi sarebbe qui un rapporto tra lipoidi e xantofilla. Ma poichè da più di un autore è stato assodato che l'eziolina non è identica colla xantofilla, mentre forse ha più affinità colla carotina, i rapporti si dovrebbero cercare con queste ultime sostanze. Vedremo ben tosto che a tale risultato conducono del pari le mie ricerche sui pigmenti gialli e rossi dei fiori.

Ho pure rivolta la mia attenzione alle foglie variamente colorate (parzialmente albicate od antocianiche) e quasi sempre ho riscontrato che le parti bianche presentano dei plastidi sforniti di lipoidi. Evidenti pure sono le differenze se si confrontano fra loro le parti verdi di una foglia con quelle colorate dall' antocianina, il che è probabilmente in rapporto colla funzione del pigmento antocianico nei riguardi dell' assimilazione clorofilliana (v. in proposito L. Buscalioni e G. Pollacci, Le antocianine e il loro significato biologico nelle piante. Atti del R. Istituto Botanico di Pavia 1903).

Attorno alle lesioni ed alle produzioni patologiche ha luogo spesso un accumulo dei lipoidi endoclorofilliani, forse in rapporto cogli stimoli che i fattori morbosi esercitano sul cloroplasto. Le mie osservazioni in

proposito, ancora molto incomplete, verranno quanto prima riprese ed estese ai vari processi morbosi.

Quando le foglie hanno un tessuto acquifero centrale i piccoli cloroplasti, talsia ridotti quasi allo stato di leucoplasti, presenti assai spesso nelle cellule ricche d'acqua sono più poveri di lipoidi, rispetto a quelli delle parti verdi.

Questi sono, per sommi capi i principali risultati delle mie osservazioni sulle foglie; essi verranno ben tosto ripresi, essendo mia intenzione sottoporre le piante all' esperimento fisiologico per analizzare in quale misura la radiazione, la nutrizione, la presenza o l'assenza di particolari gas, in specie l' accumulo o la deficenza del $CO_2$, ed altri fattori possano influire nella produzione dei lipoidi nei plastidi. Passiamo ora al caule.

Nelle parti giovani di questo, al pari che nelle foglie in via di sviluppo, i lipoidi endoclorofilliani o sono scarsi o mancano del tutto. Questi cominciano ad aumentare notevolmente, ma limitatamente agli strati superficiali della corteccia, nel periodo in cui si inizia la produzione del sughero, ben inteso in tutti quei casi in cui il fellogeno è localizzato piuttosto superficialmente.

Nei cauli adulti gli strati di parenchima ad intimo contatto col fellogeno sono totalmente ripieni di lipoidi endoclorofilliani, mentre difettano di granuli d'amido i quali invece si fanno sempre più numerosi e grandi a misura che ci avviciniamo alle parti profonde del tessuto corticale, dove i lipoidi tendono a scomparire, o ad assumere più esigue dimensioni.

Se anche qui vi sia una vicenda nello sviluppo dei lipoidi in rapporto colle stagioni o con altri fattori decideranno le osservazioni che ho iniziato.

Molto difficile è l'osservazione dei lipoidi nei cloroplasti e cromoplasti fiorali: ciò non di meno grazie alla tecnica microscopica impiegata, sono riuscito a fissare i cromoplasti, i quali altrimenti si rigonfiano o si diffanno nell' acqua e nella glicerina.

Nei fiori ancora chiusi e a involucri fiorali verdicci, i cloroplasti sono poverissimi di lipoidi: questi cominciano a farsi numerosi e grossi allorchè si inizia la comparsa della xantofilla, o della carotina. Non occorre aggiungere che le mie osservazioni si riferiscono a quei fiori che devono la loro colorazione ai pigmenti inglobati nei plastidi, anzichè all' antocianina, quali sono appunto per lo più i fiori gialli e rossi. Nei fiori aperti, che hanno perciò acquistata la loro colorazione definitiva i lipoidi si presentano diffusissimi nei plastidi.

La forma di siffatti lipoidi è quanto mai varia, e si può dire che nelle differenti specie di fiori, oltre la forma, forse anco la costituzione è differente.

Io non starò qui a descrivere i vari tipi di siffatti corpi: solo credo utile rilevare che spesso, come del resto è noto, assumono forma subcristallina; mentre in altri casi presentansi foggiati ad anello, forse in seguito ad una incompleta fissazione coi reattivi.

Le diffusione dei lipoidi nei cromoplasti gialli e rossi dei fiori ci indicherebbe che essi hanno spesse volte un indubbio rapporto colle carotine, e tale conclusione viene avvalorata dal fatto che nel *Daucus Carota* i cristalli di carotina contenuti nelle radici, cui impartiscono la colorazione giallo-rossiccia caratteristica, si colorano pure col Sudan III e quando vengono esaminati cogli obbiettivi ad immersione mostransi quasi del tutto costituiti da granulazioni lipoidee o da cristalli(?) di queste sostanze.

Ma se le osservazioni fatte sui fiori di molte piante e sulle radici di Carota hanno non poca importanza, poichè ci hanno rivelato un evidente rapporto tra i lipoidi e le carotine, dalle stesse tuttavia non è lecito trarre la conclusione che i lipoidi endoclorofilliani siano costantemente rappresentati da queste sostanze, o non piuttosto da altri corpi affini forse alla xantofilla od altri pigmenti.

Del pari interessanti sono i dati che ho potuto ottenere esaminando i lipoidi endoclorofilliani, col sussidio, ben inteso, di forti ingrandimenti e degli obbiettivi ad immersione. Le particolarità più importanti si riferiscono sia alla forma e grandezza dei granuli lipoidei, sia alla loro distribuzione nei plastidi ed al loro rapporto coi granuli d'amido.

Riassumeremo qui le principali conclusioni, inviando il lettore, per quanto concerne i lipoidi fiorali a quanto sopra è stato detto.

Raro è che i cloroplasti adulti siano (almeno nelle foglie) del tutto sprovvisti di lipoidi durante l'anno.

Molte volte i granuli lipoidei sono estremamente fini, tanto che solo con fortissimi ingrandimenti riescono visibili. A prescindere poi dalle variazioni inerenti all' età dell' organo o delle stazioni, i lipoidi si presentano talora localizzati nel centro del cloroplasto, od all' opposto formano una specie di coroncina alla periferia del plastidio. Non mancano anche i casi in cui essi appaiono quasi appiccicati agli organiti in questione.

Entro certi limiti la presenza o viceversa l' assenza di lipoidi nei cloroplasti, oltrechè la loro grandezza e distribuzione in seno al plastidio, costituiscono delle particolarità abbastanza fisse per determinati gruppi di piante [1]).

Così ad esempio in alcune famiglie non pochi rappresentanti difettano di lipoidi (mentre costante è la presenza di xantofilla nel cloroplasto): in altre, fra cui le *Cactaceae*, i lipoidi sono veramente colossali, tanto che si possono osservare senza il sussidio del Sudan III, nel qual caso appaiono come grossi globi o vacuoli in seno al plastidio verde: parimenti assai vistosi sono nell' *Araucaria Bidwillii*, almeno durante alcuni mesi dell' anno e nelle piante saccarofile: in non pochi tipi infine sono invece quasi costantemente minutissimi.

Capita spesso che in un dato plastidio o in diversi plastidi di una

---

1) Lo stesso può dirsi, entro certi limiti, anche per la distribuzione dei lipoidi nei vari strati del tessuto verde delle foglie.

cellula si incontrino dei granuli lipoidei vivamente colorati dal Sudan III accanto ad altri che fissano poco o punto il colore. Questi casi sono oltremodo istruttivi, permettendoci essi di rilevare che non pochi dei così detti vacuoli stati segnalati da più di un autore in seno ai cloroplasti non sono che corpi lipoidei.

La forma dei lipoidi è per lo più tondeggiante; non poche volte tuttavia il contorno si fa bernoccoluto, per effetto forse della fusione di più granuli elementari in uno solo.

Quasi sempre nei cloroplasti lipoidiferi, accanto ai granuli colorabili col Sudan III, si incontrano degli spazi chiari, quasi che dagli stessi i lipoidi siano scomparsi. Forse può trattarsi di veri vacuoli, ma anche qui vale quanto sopra è stato detto pei lipoidi sbiaditi.

Vi ha spesso un intimo rapporto fra la grandezza dei cloroplasti e la presenza in questi dei lipoidi. Più di un autore, specialmente in Italia, ha accennato all' esistenza, in qualche foglia, di granuli clorofilliani diversamente grandi. È mia ferma opinione che non debbasi dar troppo valore a queste osservazioni isolate, poichè il fenomeno del polimorfismo nei plastidi verdi è troppo comune, tanto nel fusto che nelle foglie. Esso è inerente allo stato di attività o di riposo del cloroplasto, alla provvista di amido in seno a questo, alla localizzazione del plastidio nel tessuto fogliare o corticale, alla presenza nella cellula di determinate sostanze, come acqua etc., allo stato fisiologico della cellula e via dicendo. Sotto questi diversi punti di vista sarebbe interessantissimo studiare il polimorfismo dei cloroplasti, mentre nessun valore hanno le osservazioni sopra citate in base a due o tre foglie prese in considerazione.

Le mie ricerche in proposito hanno rivelato che vi ha un indubbio rapporto tra la grandezza dei cloroplasti e la provvista di lipoidi nel loro interno. In generale sta il fatto che granuli ricchi di lipoidi sono più grossi di quelli sforniti, o poveri. Vi hanno pure dei rapporti tra i cloroplasti prevalentemente amiliferi e quelli prevalentemente od esclusivamente lipoidei, essendo, a seconda di parecchie circonstanze, ora più grossi gli uni ora più sviluppati gli altri.

Più di una volta mi fu dato di rilevare che nel palizzata (e talora anche nel lacunoso) di una data foglia alcune cellule presentavano granuli di clorofilla ricchi di corpi lipoidei, mentre altre ne erano povere, oppure in una determinata cellula taluni cloroplasti erano abbondantemente impregnati di tali sostanze che difettavano invece in altri. Ora in tali casi le differenze di grandezza nelle due sorte di plastidi erano spesso colossali.

Il Sudan III permette di stabilire che assai frequentemente non tutte le parti di una cellula ricca di cloroplasti funzionano uniformemente per quanto concerne la elaborazione dei lipoidi, ma non insisto su questo argomento avendo già altrove segnalato il fenomeno. Dirò solo che si ripete qui nell' ambito di una cellula, quanto si è constatato nel dominio

di tessuti o strati differenti, a riguardo dei quali vi è visto che, ad esempio, il palizzata è un centro di creazione di lipoidi endoclorofilliani (e particolarmente alcuni strati di esso) assai più attivo del lacunoso.

A nessuno sfuggirà adunque l'importanza del Sudan III come mezzo di analizzare l'attività funzionale delle cellule e dei tessuti, per quanto concerne i corpi che stiamo studiando.

Antitetici, a quanto pare, sono i rapporti coll' amido: già ho fatto rilevare che negli strati profondi della corteccia, dove abbonda questo idrato di carbonio si fanno scarsi i lipoidi, i quali invece si rendono sempre più abbondanti a misura che ci avviciniamo agli strati superficiali della corteccia del fusto dove l'amido divende sempre più scarso. In moltissime foglie carnose abbiamo notato analogo comportamento, in quantochè i tessuti ricchi di amido sono, in generale, poveri di lipoidi endoclorofilliani e viceversa. L'osservazione microscopica dimostra ancora che nei cloroplasti poveri d'amido i lipoidi sono spesso grossi e numerosi: poi a misura che i granuli amiliferi ingrossano essi si riducono a minuti corpicciuoli disseminati nello stroma interposto fra le granulazioni amilacee o alla periferia dei cloropasti. Raramente però i lipoidi scampaiono del tutto nei plastidi abbondantemente amiliferi. Questi fatti sono particolarmente evidenti nelle corteccie dei fusti, sebbene siano pure più o meno distinti nelle foglie, e in specie in quelle carnose, o a tessuto acquifero centrale molto sviluppato. In quest' ultime tuttavia i cloroplasti delle cellule acquifere, non sempre ricchi di amido, sono in generale anche poveri di lipoidi.

Ho altrove accennato che nel protoplasma delle cellule clorofilliane, come del resto anche in moltissimi elementi privi di pigmento verde, si incontrano dei corpi che si colorano col Sudan III. Talora questi sono piccoli e scarsi, talora minuti ma abbondantissimi. Non difettano i casi in cui sono grossi, scarsi e di varia forma. Così ad es. nelle foglie di talune specie si riscontra uno grosso granulo per cellula, situato quasi nel centro del protoplasma, oppure se ne osservano parecchi (da 1—4 o più) e di forma e grandezza differente.

Non vi ha dubbio che la costituzione di tali corpi deve essere quanto mai varia (resine, cere, oli, grassi, cautchouch ed altre sostanze colorabili col Sudan III), ma noi dobbiamo domandarci, se per avventura, non vi sia talora un rapporto tra alcuni di tali corpi endoprotoplasmatici e i lipoidi endoclorofilliani.

Il fatto stesso della presenza di piccoli lipoidi alla periferia dei cloroplasti o appiccicati a questi potrebbe infondere il sospetto che realmente i lipoidi possono emigrare dai plastidi, ma la cosa è piuttosto dubbia e la dimostrazione del processo di emigrazione è troppo irta di difficoltà perchè allo stato attuale della scienza sia possibile dar un giudizio tassativo. Non è improbabile, per altro, che durante la vita delle cellule alcuni plastidi (specialmente i cloroplasti) vadano a male e che si disorganizzino mettendo

in libertà i lipoidi. Qualche cosa di analogo ho potuto osservare in molte foglie; qua e là qualche cellula conteneva dei cloroplasti atrofici, raggrinzati o in via di degenerazione e questi erano pieni di lipoidi. Più di rado ho potuto osservare la degenerazione di qualche cloroplasto nell'ambito di un' unica cellula.

È invece oramai cosa assodata che nelle foglie vecchie i cloroplasti i quali, come risulta in particolar modo dalle mie ricerche, si sono notevolmente arricchiti di lipoidi, vanno soggetti a una più o meno rapida disorganizzazione accompagnata dall' ingiallimento del lembo fogliare. Orbene in questo caso è facile constatare che i lipoidi endoclorofilliani emigrano nel protoplasma cellulare e si fondono fra loro, formando così delle masse bernoccolute, di color per lo più rosso vivo col Sudan III. Le massoline emigrate non presentano caratteristiche le quali valgano a farle distinguere dai corpi pure colorabili collo stesso reattivo e presenti anche in abbondanza nel protoplasma.

Fino a che adunque non verrà in modo assoluto constatata l'emigazione di lipoidi dal cloroplasto durante il periodo di attiva vegetazione delle foglie o del fusto non potremo con sicurezza affermare che vi siano rapporti tra i corpi colorabili col Sudan III inclusi nei plastidi e quelli situati al di fuori, almeno durante il periodo di attività degli organi verdi. La relazione è però oltremodo probabile.

Lo studio microchimico dei lipoidi contenuti nei differenti plastidi, limitato fino ad ora a poche specie, non ha offerto risultati notevoli, se si eccettua che ho potuto constatare che i corpi che stiamo studiando, a seconda delle piante da cui derivano, si comportano differentemente rispetto all' alcool, all' etere ed ad altri solventi dei corpi grassi, resinosi o di affine costituzione.

Col Sudan III si ottengono del pari colorazioni differenti nelle diverse piante e talora in uno stesso organo, a seconda del mese in cui fu studiato. Talora il colore è rosso intenso, talora giallo più o meno carico, talora bruno, o quasi nerastro. Tali differenze cromatiche sono indubbiamente collegate a differenze nella costituzione chimica ed io ho già altrove emessa l'ipotesi che la colorazione bruno-nerastra sia dovuta, forse, a processi ossidativi.

Non può passare inosservato che i lipoidi dei cromoplasti sono normalmente colorati, per lo più in giallo o rosso, quelli dei cloroplasti invece incolori. Ciò indica anche evidentemente una differente costituzione, ed io oserei avanzare la supposizione che qui siamo di fronte a disposizioni similari inerenti ad altri tipi di colorazioni comunissime nei fiori, ma anche abbastanza diffuse negli organi vegetativi, in specie se esposti alla luce. Intendo parlare delle antocianine, alla formazione delle quali interviene un cromogeno dapprima incoloro[1]).

[1]) V. in proposito L. Buscalioni e E. Pollacci, Le antocianine e il loro significato biologico nel regno vegetale. Atti dell' Istituto Botanico di Pavia 1903.

In base a questa ipotesi i lipoidi incolori dei plastidi verdi sarebbero analoghi ai leucocromogeni che danno origine a taluni colori vegetali, mentre i lipoidi colorati dei fiori sarebbero un prodotto di ossidazione del cromogeno. Una tale ipotesi è avvalorata dal fatto che nei fiori le ossidazioni — molte volte inerenti alla presenza di enzimi ossidanti — avvengono su vastissima scala. È noto del resto che le sostanze lipoidee assorbono facilmente certe sostanze coloranti.

La reazione cromatica provocata dal Sudan III nei lipoidi essendo comune a molti corpi (grassi, oli, resine etc.) mi ha lasciato in dubbio sulla vera natura loro, nè mi fu dato di poi, malgrado le altre reazioni microchimiche impiegate (azione dell' alcool, dell' etere e via dicendo), addentrarmi maggiormente nella loro intima costituzione. Ho perciò lasciate da parte le denominazione di corpi grassi, oleosi, resinosi etc. perchè queste sono troppo tassative e il loro significato troppo preciso e specifico, mentre la costituzione dei lipoidi contenuti nei plastidi è ancor quanto mai oscura. In base a queste considerazioni mi sono attenuto alla denominazione più generica di corpi lipoidei o lipoidi, la quale già applicata dagli istologi nel campo medico e zoologico per una determinata categoria di corpi non ben definiti, ma che si comportano, sotto molti punti di vista, come i grassi e corpi analoghi, non pregiudica in alcun modo il problema dell' entità chimica dei corpi in questione. Ho pure avuto presente che oggiorno più di un istologo ha rivelate l'enorme importanza che offrono i lipoidi nelle manifestazioni più svariate della vita cellulare, sia dell' uomo che degli animali, e all' scopo basterà ricordare che nei processi involutivi dell' utero hanno larga parte appunto i lipoidi che, occorre notarlo, si colorano del pari ottimamente col Sudan III.

Vedremo ben tosto come non sia improbabile che anche ai lipoidi dei vegetali spetti molta parte nella vita cellulare e specialmente nei processi d'ossidazione. Ce lo attesta la loro larga diffusione entro le cellule e tutti gli studi recenti di Ehrlich, Bang, Overton ed altri autori, su tali corpi.

Giunti a questo punto è lecito domandarci quale sia la funzione dei lipoidi contenuti nei plastidi e in specie quali rapporti possano gli stessi contrarre col processo fotosintetico dell' assimilazione clorofilliana. A priori diversa essendo la intima natura dei lipoidi nei cromoplasti e nei cloroplasti differente pure deve esser la loro funzione. Se però cerchiamo di penetrare nell' intimità del problema che ci siamo proposti troviamo ben tosto che il compito diventa quanto mai arduo, tanto più che da poco ho iniziato l'esperimento fisiologico dal quale soltanto si può attendere la soluzione parziale o totale della questione.

Allo stato attuale dalle mie ricerche ecco quanto posso affermare, o per lo meno enunciare sotto forma di ipotesi più o meno attendibile.

1°) Poichè i lipoidi si formano nei cloroplasti allorchè questi hanno superato il periodo giovanile e cominciano ad assimilare è probabile che

la loro comparsa sia collegata col processo fotosintetico chlorofilliano, sia direttamente che indirettamente. Solo pei lipoidi che si formano nei cloroplasti senili, o in quelli che si trasformano in cromoplasti è lecito, forse, supporre un' indipendenza dal processo fotosintetico in questione.

2°) Il rapporto colla fotosintesi clorofilliana appare manifesto anche pel fatto che nelle foglie, in generale, i lipoidi sono presenti in maggior copia nel palizzata anzichè nel lacunoso. Ora noi sappiamo che il primo è quasi constantemente più esposto alla radiazione diretta del secondo. E per le stesse ragioni vediamo crescere il tenore in lipoidi nelle cellule superficiali del lacunoso. Pare però che spesso la produzione dei lipoidi sia collegata ad un optimum di radiazione, per cui si spiega come non sempre le parti più superficiali delle cellule del palizzata, o lo strato sotto-epidermico di questo siano più abbondantemente fornite di lipoidi.

3°) La presenza di lipoidi nelle cellule sottostanti immediatamente al sughero nel caule, la loro diminuzione nelle parti profonde della corteccia depongono in senso quanto mai consono alla mia ipotesi. Qui però il rapporto coll' assimilazione del $CO_2$ e la formazione dell' amido pare un po' meno evidente poichè gli strati più ricchi in lipoidi sono meno ricchi di amido e viceversa. Ho già altrove accennato a questa particolarità e noi vedremo ben tosto come il singolare fenomeno sia suscettibile di spiegazione. Non può d'altra parte escludersi che i lipoidi talora rappresentino un modo speciale di assimilazione clorofilliana, come ce lo attesta lo studio delle Alghe, che rivela spesso una grande diffusione dei corpi lipoidei nei cloroplasti o l'esame delle Musacee ed altre poche Monocotiledoni in cui l'amido è sostituito nei cloroplasti pure da sostanze oleose.

4°) L'oscillazione cui va incontro la provvista di lipoidi nei cloroplasti, a seconda delle stagioni, indica a sua volta che ci troviamo di fronte a processi formativi inerenti alla assimilazione ed in funzione della temperatura, oltre che della luce.

5°) Molte delle osservazioni fatte tendono a metter in evidenza che tra la formazione dei lipoidi e la produzione dell' amido vi ha quasi un comportamento antitetico, nel senso che dove l'amido viene formato in abbondanza diminuisce la produzione di lipoidi e viceversa. Forse l'antitesi è più apparente che reale potendo verificarci il caso che i lipoidi si trasformino in amido. Allo stesso risultato ci condurrebbe del pari l'osservazione delle oscillazioni nella produzione dei lipoidi endoclorofilliani nel corso dell' anno ed in rapporto alle vicende cui va pure incontro la provvista dell' amido nelle varie stagioni.

6°) È dubbio che si abbia, almeno in molti casi e più particolarmente allorchè si tratta di lipoidi endoclorofilliani, un diretto ed immediato rapporto tra la respirazione e la produzione di lipoidi nei plastidi; solo per altro ricerche fisiologiche (ora appena iniziate) potranno forse risolvere la questione, o per lo meno portar un po' di luce sulla stessa. A priori si

dovrebbe quasi escludere tale rapporto, poichè i lipoidi endoclorofilliani sono in particolar modo abbondanti al di sotto della zona fellogenica, dove gli spazi intercellulari sono poco ampi, mentre difettano negli strati profondi della corteccia del fusto, dove i meati si mostrano piuttosto sviluppati: in secondo luogo, fatte le debite ma rare eccezioni, non si è trovato maggior copia di lipoidi in immediata vicinanza delle camere retrostomatiche: infine il lacunoso fogliare, più abbondantemente percorso da meati intercellulari, presenta dei cloroplasti per lo più assai meno ricchi di lipoidi (eccezione fatta per gli strati sottoepidermici del tessuto) in confronto del palizzata a cellule più stipate fra loro. Aggiungasi che si è visto che talora i lipoidi abbondano nei cloroplasti delle cellule marginali della foglia ad immediato contatto dei fasci meccanici, dove gli stomi sono rari e l'aerazione si mostra ridotta.

7°) Non per questo i lipoidi dei plastidi devono essere considerati quali produzioni indipendenti dai processi d'ossidazione. All' opposto è mia opinione che essi compaiano nei cloroplasti e cromoplasti appunto in grazia dei processi di questa natura che ivi hanno luogo, e in cui l'O. compie un ufficio non indifferente. Nei fiori infatti, dove abbondano le carotine, sono stati segnalati intensi processi d'ossidazione; inoltre le carotine ed altre sostanze analoghe pigmentate sono ritenute, da più di un autore, come corpi dotati di una forte carica di ossigeno, o in altre parole quali portatori di questo corpo. In conseguenza analoga conclusione deve trarsi per i lipoidi dei cromoplasti.

Per quanto concerne i lipoidi dei cloroplasti farò osservare che nel processo di assimilazione fotosintetica si rende libero dell' ossigeno nell' atto della scomposizione del biossido di carbonio: ora tale gas potrebbe appunto essere fissato parzialmente dai lipoidi endoclorofilliani. A conferma di questo asserto ricorderemo che alcuni autori hanno segnalato nei plastidi (ma dal punto puramente chimico) accanto alla clorofilla delle sostanze di natura affine alle carotine, le quali avrebbero appunto il compito di fissare l'ossigeno. Le mie ricerche tenderebbero pertanto ad avvalorare il reperto puramente chimico.

Considerati adunque i lipoidi sotto questo punto di vista ne verrebe logica la deduzione che essi siano dei portatori di ossigeno e in certo qual modo avrebbero funzione ossidante. Quest' ipotesi trova ben forte appoggio nel reperto microscopico, poichè più volte ho notato che sotto l'azione del Sudan III i lipoidi endoclorofilliani si colorano in bruno forse per intensa ossidazione della sostanza colorante; essa è pure appogiata dal reperto anatomico il quale ci rivela come i lipoidi siano in maggior copia nel palizzata sul quale strato indubbiamente agisce con più intensità la radiazione neccesaria per la scomposizione del $CO_2$, anzichè nel lacunoso meno esposto alla luce. Ma poichè in generale la pagina superiore delle foglie è meno ricca di stomi e perciò l'aerazione dei tessuti meno energica devesi ammettere che l'immagazzinamento di O. per parte dei lipoidi abbia luogo

durante il processo fotosintetico dell' assimilazione, come conseguenza diretta dello sdoppiamento del $CO_2$.

8°) Non è improbabile che i lipoidi (in largo senso) abbiano la costituzione delle lecitine o dei fosfatidi vegetali. Le lecitine furono invero trovate nei saggi chimici dei cloroplasti per quanto le osservazioni del Willstaetter abbiano dimostrato che la clorofilla non è una lecitina, e ciò in opposizione ad altri autori.

Ora è lecito domandarsi se la presenza di corpi lecitinici nei cloroplasti abbia una certa importanza fisiologica.

Anche a questo riguardo ci troviamo in un campo quanto mai irto di spine. Osservo per altro che i cloroplasti, secondo alcuni autori, nascerebbero da corpi di natura mitocondriale, le cui esistenza e grande diffusione nelle cellule vegetali ed animali, specialmente attive, è stata messa recentemente in evidenza.

Il Russo ed altri autori hanno dimostrato che le lecitine o i mitocondri, da queste costituiti, compiono un ufficio importantissimo nella nutrizione degli ovuli e di altri tessuti animali: forse non è improbabile che, fra l'altro, portino anche alle cellule e diffondano in queste l'ossigeno di cui sono abbondantemente forniti.

Anche nei giovani corpuscoli di sangue, del resto, furono segnalate formazioni mitocondriali sulle quali si fisserebbe di poi l'emoglobina, ma ignoriamo se esse siano di natura lecitinica.

È però stato assodato che nei globuli rossi del sangue esistono parecchie specie di lipoidi e che ad essi si deve in particolar modo il comportamento dei globuli rossi rispetto alle sostanze emolizzanti.

Noi sappiamo pure che mentre la sostanza cromatica dei globuli rossi del sangue, contenenti Fe, ha le proprietà di fissare l'ossigeno dall' altro presenta allo spettroscopio e all' analisi chimica una strettissima affinità colla sostanza verde delle piante fissatrici del Ce contenente Mg. I colori dei due pigmenti sono però antitetici come antitetica è la loro funzione. Dobbiamo, per altro rilevare, che le due sorte di elementi, corpuscoli rossi del sangue e granuli clorofilliani, presentano il pigmento fissato ad un substrato mitocondriale comune, non estraneo, forse, alla fissazione dell' ossigeno. Nel granulo di clorofilla il pigmento verde è divenuto atto a catturare il carbonio, mentre ai lipoidi endoclorofilliani (e più ancora a quelli colorati da pigmenti analoghi, per aspetto, a quello del sangue) fu assegnata, probabilmente, la funzione di fissare l'ossigeno. Nei plastidi verdi questa è però pressochè completamente mascherata dalla funzione in parte antagonistica del pigmento verde.

Questi sono i dati che fino a tuttoggi sono venuti in luce nei miei studi di indole puramente istologica e biologica. Ricerche di carattere fisiologico a cui sto attendendo verranno più tardi a convalidare le attuali vedute, o a modificarle. Prima di chiudere questa breve nota preliminare ritengo,

per altro, opportuno di far rilevare che le mie ipotesi sui lipoidi dei cloro- e cromoplasti trovano un forte appoggio anche nelle recenti ricerche che parecchi esperimentatori (Ehrlich, Bang, Overton, Arrhenius, Erlandsen, Noguchi, Morgenroth, Thudichum ed altri) hanno effettuato su corpi analoghi dell' uomo e degli animali.

Dalla interessante opera di Ivan Bang »Chemie und Biochemie d. Lipoiden (Wiesbaden 1911)« rilevasi infatti che le sostanze lipoidee sono corpi di varia natura, spesso associati a N. P. e S., ed affinissimi ai grassi ed oli, i quali devono essere aggruppati in parecchie categorie (fosfatidi, colesterine etc.).

Molti di essi (fosfatidi ad es.) sono costituiti da acidi grassi non saturi, mentre altri contengono questi allo stato saturo: i primi sono più o meno solubili, i secondi assai meno.

Il comportamento dei lipoidi rispetto agli ordinari solventi dei grassi (alcool, etere, solfuro di carbonio ètc.) varia a seconda della natura loro e del loro stato di combinazione chimica, o di associazione fisica con determinati corpi. Qui pertanto noi troviamo le spiegazione del fatto da me altrove segnalato che, cioè, i differenti lipoidi clorofilliani presenti nelle specie vegetali da me studiate offrono pure un vario comportamento rispetto a detti solventi.

Notevole, del punto di vista dei miei studi, è la constatazione fatta da più di un autore che taluni lipoidi (colesterine, fosfatidi etc.) sotto l'azione della luce si possono colorare e spesso la tinta che assumono è quella gialla che noi vediamo largamento diffusa nei cromoplasti.

Neppur devonsi lasciar passare inosservate le proprietà che hanno i lipoidi non saturi di fissare più o meno labilmente, o viceversa energicamente l'ossigeno. Ricorderò qui solo che nel sangue i lipoidi si fissano all' ossigeno, ma in modo labile, mentre nelle piante, secondo Palladin e Stanewitsch essi, quando non sono saturi, compiono un ufficio non indifferente nell' eliminazione del $CO_2$.

Essi sono dunque delle vere ossidasi ed invero il Bang ha rinvenuto appunto nei globuli rossi delle sostanze affini alle perossidasi. Va notato che molte lecitine ossidate si presentano più solubili di quelle che non lo sono, ma non è soltanto coll' ossigeno che i lipoidi possono collegarsi, in quantochè noi vi vediamo associarsi, sempre in combinazioni labili o energiche, con altri gas, come $CO$, $CO_2$ etc.

Oltre a ciò, mentre taluni lipoidi vanno considerati come portatori di ossigeno, altri funzionano come corpi attivatori (secondo Minani) o viceversa come inibitori (secondo Centanni) delle diastasi. Se ora noi consideriamo che i lipoidi da me studiati sono presenti là dove ha luogo un' attiva formazione di amido, colla susseguente dissoluzione di questo corpo, la scoperta di Minani e Centanni deve richiamare la nostra attenzione. Aggiungerò ancora che i fosfatidi vegetali, come taluni lipoidi degli animali,

(Jecorina) sono collegati a zuccheri (in specie i primi) che li rendono più o meno solubili.

Le associazioni che formano i lipoidi coi differenti corpi, come si è detto, sono spesso labili, e la dissociazione avviene qui secondo le leggi del coefficiente di dissoluzione e della parziale pressione. Su queste due proprietà è specialmente rivolta l'attenzione dei moderni fisiologi e chimici, poichè tali leggi, a quanto pare, regolano l'assorbimento e determinano quindi la tossicità di alcuni composti che penetrano attraverso la membrana lipoidea delle cellule (in specie nervose e dei corpuscoli del sangue), fissandosi alla stessa (Overton).

L' importanza dei lipoidi nelle funzioni delle cellule è adunque pari a quella del protoplasma e del nucleo. Essi sono corpi destinati non solo alla nutrizione cellulare, ma sibbene ancora funzionano come enzimi, come attivatori o inibitori di questi, come chimasi e via dicendo.

Per lo studio che forma oggetto della presente nota ha però una speciale importanza il fatto, ormai conclamato, che i lipoidi sono corpi ossidabili, colorabili alla luce, per lo più capaci di entrare in combinazione cogli zuccheri od anche colle sostanze albuminoidee (vitelline, lecitoalbumine) e funzionanti infine, qualche volta come diastasi, o come eccitatori o all' opposto inibitori di queste.

Colle sopra esposte vedute io sono tuttavia ben lungo dal voler assegnare esclusivamente ai lipoidi dei plastidi le svariate funzioni cui ho accenuato: non vi ha dubbio che anche ai lipodi endoplasmici spetta un compito importante nelle vita delle cellule come anche alla così detta membrana lipoidea di Overton (sebbene non da tutti ammessa). Tutte quante siffatte sostanze entrano in giuoco, in specie nel processo respiratorio ed esse quindi possono far variare notevolmente il quoziente respiratorio. Non per questo tuttavia riesce diminuita l'importanza dei lipoidi de cloroplasti e cromoplasti che io ho segnalato nelle presenti ricerche.

Berlin (Dahlem), K. Bot. Institut, Sept. 1913.

---

Druck von Breitkopf & Härtel in Leipzig.